

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-147534

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月2日

(51) Int.Cl.⁶

A 6 1 K 35/60

35/84

45/00

識別記号

A D U

A A H

A E D

F I

A 6 1 K 35/60

35/84

45/00

A D U

A A H

A E D A

審査請求 有 請求項の数 9 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号

特願平8-324595

(22) 出願日

平成 8 年 (1996) 11 月 19 日

(71) 出願人 593088108

八木田 旭邦

東京都三鷹市大沢 1 - 1 - 21

(71) 出願人 591127917

株式会社セイシン企業

東京都渋谷区千駄ヶ谷 5 丁目 27 番 7 号

(71) 出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目 20 番 3 号

(72) 発明者 八木田 旭邦

東京都三鷹市大沢一丁目 1 番 21 号

(74) 代理人 弁理士 安富 康男 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 腫瘍新生血管阻害物質及び医薬組成物

(57) 【要約】

【課題】 腫瘍新生血管阻害物質としてのサメ軟骨を抗癌剤として有効に投与することができる医薬組成物を提供し、更に、このような腫瘍新生血管阻害物質と I L - 1 2 誘導物質とを併用して有用な抗癌作用剤を提供する。

【解決手段】 油脂マトリックス内に微粉末状のサメ軟骨を包埋させ、前記マトリックス表面を、前記油脂とは融点異なる他の脂質類で更にコーティングしてなる腫瘍新生血管阻害物質。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 油脂マトリックス内に微粉末状のサメ軟骨を包埋させ、前記マトリックス表面を、前記油脂とは融点異なる他の脂質類で更にコーティングしてなることを特徴とする腫瘍新生血管阻害物質。

【請求項2】 微粉末状のサメ軟骨からなる腫瘍新生血管阻害物質であって、前記微粉末状のサメ軟骨は、粒径 $32\mu\text{m}$ 以下のものが99.5重量%以上を占めるものである腫瘍新生血管阻害物質。

【請求項3】 サメ軟骨が、ヨシキリザメを原料とするものである請求項1又は2記載の腫瘍新生血管阻害物質。

【請求項4】 請求項1、2又は3記載の腫瘍新生血管阻害物質を主成分とすることを特徴とする医薬組成物。

【請求項5】 請求項1、2又は3記載の腫瘍新生血管阻害物質を主成分とすることを特徴とする抗癌剤。

【請求項6】 請求項1、2又は3記載の腫瘍新生血管阻害物質を、腫瘍新生血管を阻害するのに充分な量投与することを特徴とする癌治療方法。

【請求項7】 腫瘍新生血管阻害物質とインターロイキン12誘導物質とを含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項8】 腫瘍新生血管阻害物質とインターロイキン12誘導物質とを含有することを特徴とする抗癌剤。

【請求項9】 腫瘍新生血管阻害物質とインターロイキン12誘導物質とを併用することを特徴とする癌治療方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は、抗癌作用及び鎮痛作用に優れた腫瘍新生血管阻害物質、これを含有する医薬組成物及び癌治療方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 サメ（鮫）は軟骨魚綱に属する魚で、陸部近郊に生息している。サメの骨格は軟骨であり、サメを捕獲、屠殺しその軟骨を取得して製するサメ軟骨は、腫瘍抑制効果を有し、癌治療に有効であることが知られており、例えば、米国産サメ軟骨製品であるカートイレイドは、抗腫瘍物質として市販されている。

【0003】 腫瘍は、 $1\sim 2\text{mm}^3$ 程度の大きさになると新生血管促進物質を産生し、腫瘍自身の増殖に必要な栄養と酸素とを供給するようになる。この新生血管の増殖を抑制することが腫瘍細胞の肥大化を抑制し癌治療に有効であるところから、新生血管の阻害作用物質についての種々の研究が行われているが、サメ軟骨にこの新生血管を阻害する作用があることが判っている。

【0004】 しかしながら、サメ軟骨は、その新生血管阻害のための有効量が1日当たり $50\sim 60\text{g}$ と極めて多量であり、味、臭いとも不快であって経口投与が困難な場合が多かった。サメ軟骨はムコ多糖類の混合物であ

って、経口投与による以外に適切な投与方法がなく、経口投与時には強酸性である胃内では溶解せずに吸収部位である腸において溶解する性質を有する必要があった。また、癌患者の多くは衰弱が激しく経口投与が困難である場合が多いので、このような味、臭い、及び、投与量の問題を解決しなければ、サメ軟骨を有効でかつ汎用性の高い抗癌剤として適用することができない状況であった。そこで、サメ軟骨を有効な腫瘍新生血管阻害物質として活用することが強く求められていた。

【0005】 ところで、インターロイキン12（IL-12）は、初め、NK細胞の活性化作用を有するサイトカインの一つとして発見されたものであるが、その後の研究により、腫瘍細胞に対して特異的な細胞障害活性を有するT細胞（キラーT細胞）の増殖作用及び活性化作用を有することが判明し、更には、キラーT細胞の活性化を促す作用を有するインターフェロン γ （IFN γ ）の産生増強作用を有することが認められるに至り、ヒト癌患者の治療に有用な物質として注目されている。

【0006】 IL-12については、最近、米国において、遺伝子操作により大量に生産されることに成功した（レコンビナントIL-12（rt-IL-12））。その後、IL-12を、癌細胞に直接投与する目的で、このインターロイキン12産生遺伝子を癌細胞に遺伝子導入手法により、直接導入する方法も試行されている。

【0007】 IL-12を活用して腫瘍の増殖喪失又は消失を図るためには、IL-12を外から投与する方法のほか、生体内に自己のIL-12を誘導せしめる方法がある。このような自己IL-12は、異常な免疫反応が生じるおそれがない等の利点をも有し、感受性の高いものであるので、多大の腫瘍喪失消失効果が期待されるものであった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 上記の現状に鑑み、本発明は、腫瘍新生血管阻害物質としてのサメ軟骨を抗癌剤として有効に投与することができる医薬組成物を提供することを目的とするものである。本発明の目的は、更に、このような腫瘍新生血管阻害物質とIL-12誘導物質とを併用して極めて有用な抗癌作用剤を提供することにもある。

【0009】

【課題を解決するための手段】 本発明は、油脂マトリックス内に微粉末状のサメ軟骨を包埋させ、前記マトリックス表面を、前記油脂とは融点異なる他の脂質類で更にコーティングしてなることを特徴とする腫瘍新生血管阻害物質である。以下に本発明を詳述する。

【0010】 本発明の腫瘍新生血管阻害物質の主成分であるサメ軟骨は、微粉末状でなければならない。本明細書において、微粉末状とは、その粒径が $1\sim 90\mu\text{m}$ であることを意味する。このような微粉末状サメ軟骨を得るためには、例えば、市販のサメ軟骨を微粉末化するこ

とが好ましい。上記微粉末化は、サメ軟骨中の有効成分である蛋白質等が60℃を超えると熱変性して効力を失うことから低温下に行うことが必要である。上記低温下での微粉末化は、例えば、サメ軟骨を-196℃の液体窒素で瞬間冷凍した後、オリエントミル等のカッター式粉碎機を用いて粗粉碎し、次に、冷凍状態のままインペラールミル等の高速ローター型粉碎機で粉碎し、更に、ジェットミル等の気流式粉碎機にかけることにより行うことができる。

【0011】本発明の腫瘍新生血管阻害物質の調製にあたっては、油脂マトリックス内に上記微粉末状サメ軟骨を包埋させる。上記油脂マトリックスを構成する油脂としては、医薬用として通常用いられているものであれば特に限定されず、例えば、大豆油、ナタネ油、パーム油、コーン油、綿実油等の植物硬化油；牛脂、豚脂、魚油等の動物硬化油；これらの混合物等のうちから適宜選択することができる。なかでも、融点が42～56℃の油脂が好ましい。また、場合によっては、ビタミンE、カテキン等の抗酸化剤を併用してもよい。

【0012】上記微粉末状のサメ軟骨を上記油脂をマトリックスとして包埋させる方法としては特に限定されず、例えば、溶解させた上記油脂と微粉末状サメ軟骨とを混合しながら高速攪拌造粒機内において造粒させることにより包埋させることができる。

【0013】上記のようにして製造した微粉末状サメ軟骨包埋油脂マトリックスは、次に、上記油脂とは融点異なる他の脂質類で、その表面を更にコーティングする。本発明の脂質類としては、先に油脂マトリックスを作製するために用いた油脂とは融点異なるもの、通常は融点が高いものを選択すれば良い。具体的には、例えば、カルナバロウ、ライスワックス、ミツロウ等のワックス類、動植物硬化油類、ステアリン酸、パルミチン酸等の脂肪酸類、シェラックのような天然樹脂類、パルミチルアルコール、ステアリルアルコール等の高級アルコール等を挙げることができる。また、上記コーティングにあたっては、例えば、パウダーコーティング法等の方法を用いることができる。

【0014】本発明の腫瘍新生血管阻害物質を調製するにあたっては、上記のほか、例えば、あらかじめ溶解させた油脂中に上記微粉末状サメ軟骨を分散させて、スプレーコーリングした後、転動造粒機内で、上記油脂とは融点異なる他の脂質類の微粉末状のものをコーティングする方法等を採用することもできる。

【0015】上記のようにして調製した本発明の腫瘍新生血管阻害物質は、サメ軟骨を主成分とし、しかも、味と臭いとが完全にマスキングされることによって経口投与における困難性を完全に払拭することができる。また、調製された腫瘍新生血管阻害物質の表面における摩擦が低減することにより、流動性が向上しており、付着力が低下して経口投与に極めて適切な製剤とすることが

できる。更に、胃内における強酸性状況では溶解せず、吸収部位である腸において溶解するようにすることができる。

【0016】本発明の微粉末状サメ軟骨は、粒径32μm以下のものが99.5重量%以上を占めるものである。後に実施例で詳述するように、本発明の微粉末状サメ軟骨の粒径は、その効果に極めて大きな影響を有しており、粒径が大きすぎると、腫瘍新生血管阻害作用が低下する。サメ軟骨の粒径を揃える方法としては、微粉末状サメ軟骨を、例えば、所望のメッシュのフルイに通過させる方法等を挙げることができる。

【0017】本発明に用いるサメ軟骨の原料となるサメの種類は限定されないが、特にヨシキリザメから取得されるサメ軟骨が好ましい。ヨシキリザメから取得されるサメ軟骨は、含有されている有効成分である蛋白質、ムコ多糖類が多く、特に良好である。なお、米国産のカーティレイドは、多種類のサメを原料として混合して製造するものであるため、ロットによって製品にバラツキが見られ、その効果も低いことが欠点となっている。

【0018】本発明の腫瘍新生血管阻害物質は、単に腫瘍新生血管阻害作用を有するばかりではなく、確実な鎮痛作用を有することが判っている。癌患者は、特に末期癌の場合には、激しい疼痛を伴うことが通常である。従って、疼痛を有する癌患者に本発明の腫瘍新生血管阻害物質を抗癌剤として投与した場合、その抗癌作用と鎮痛作用とが相乗効果を現して極めて有効な治療効果を得ることができる。

【0019】本発明の腫瘍新生血管阻害物質が、いかにしてその腫瘍新生血管阻害効果を発現するかについて検討したところ、以下の実施例で詳述するように、apoptosisによるものであることが示唆されている。

【0020】本発明の腫瘍新生血管阻害物質は、抗癌剤として極めて有用であるが、鎮痛効果をも有していることから、他の医薬用途として活用することができるので、本発明の腫瘍新生血管阻害物質を含有する医薬組成物もまた、本発明の一つである。更に、本発明の腫瘍新生血管阻害物質を、その腫瘍新生血管阻害効果を発現することができる量だけ、投与することにより抗癌治療を行う方法もまた、本発明の範囲に含まれるものである。

【0021】本発明の医薬組成物は、腫瘍新生血管阻害物質とインターロイキン12誘導物質とを含有することを特徴とするものである。上記医薬組成物は、第二の本発明を構成するものである。以下に、第二の本発明について詳述する。

【0022】本明細書において、「インターロイキン12誘導物質」という語は、単に生体内にインターロイキン12(IL-12)を誘導しうる物質のみを意味するものではなく、IL-12そのものであっても良いし、IL-12遺伝子導入癌細胞であっても良いし、rt-IL-12であっても良く、要するに、生体内にIL-

12が生じるものであれば特に限定されるものではない。このようなものとして、例えば、活性化ヘミセルロース (Active Hemi Cellulose Compound (AHCC)) 等を挙げることができる。AHCCは、キノコの菌糸の細胞壁に含まれる植物繊維を酵素処理した生理活性物質として既に公知の物質であり、 β -(1 \rightarrow 3) D-グルカン、 β -(1 \rightarrow 6) D-グルカンのほか、 α -(1 \rightarrow 4) D-グルカン等のヘテログルカン、ペプチドグルカン、プロテオグルカン、レクチン、核酸、不消化性多糖等を含有するものである。

【0023】本発明のIL-12誘導物質は、上記AHCCのほか、キノコ菌糸成分等を挙げることができる。上記キノコ菌糸成分としては特に限定されず、例えば、公知の抗癌剤として使用されているサルノコシカケの菌糸成分であるPSK、スエヒロタケの菌糸成分であるSPG、シイタケの菌糸成分であるレンチナン等を挙げることができる。また、このようなキノコ菌糸成分としては、更に、例えば、アガリクス、霊芝、ニンギョータケ、カワリハラタケ、ニオウシメジ、カベノアナタケ、マイタケ、ヤマブシタケ、ヒラタケ、マンネンタケ、ムキタケ、コブタケ、カイガラタケ、マツタケ、ヒラタケ、ベッコウタケ、ナメタケ、エノキダケ等のキノコ類菌糸成分を挙げることができる。

【0024】本発明のIL-12誘導物質としては、更に、溶連菌の菌体成分等を挙げることができる。このような溶連菌の菌体成分としては特に限定されず、例えば、OK-432等の公知の抗癌剤等を挙げることができる。これらは、生物学的活性化物質 (Biological response modifier (BRM)) として、既に公知の物質である。

【0025】上記IL-12誘導物質は、キラーT細胞の活性化を促す作用を有する。従って、上記IL-12誘導物質によって、生体内キラーT細胞が活性化する。一方、上に詳述した腫瘍新生血管阻害物質は、癌細胞(腫瘍細胞)の新生血管の増殖を抑制する。新生血管の増殖を抑制された腫瘍細胞は、その阻血によるストレスにより腫瘍表面に、Fas抗原、CD80、CD86等の接着因子を発現する。キラーT細胞は、このようなFas抗原、CD80、CD86等の接着因子を抗原認識する能力を有しているので、発現したこれら接着因子はキラーT細胞により容易に認識されうる状態となる。そして、このように容易に認識されるように変化した腫瘍細胞は、キラーT細胞に容易に攻撃されやすくなることとなる。このような状態において、上記IL-12誘導物質が存在すれば、単にIL-12誘導物質のみの作用によるのと比較して格別顕著に腫瘍細胞を攻撃しやすくなる。本発明の腫瘍新生血管阻害物質とIL-12誘導物質との相乗効果は、上記メカニズムに従って行われ、そのことにより、強力な抗癌作用が発現し、そして、a

popptosisが起こって腫瘍細胞が破壊されてゆくこととなる。このことは、本発明者によって初めて見いだされたものである。

【0026】本発明の医薬組成物をヒト又は動物に投与する場合の形態としては特に限定されず、例えば、担体に担持させて種々の医薬品に用いられる剤型として、適宜適用することができる。このような担体としては、固形、半固形、又は液状の希釈剤、充填剤、及びその他の処方用の助剤一種以上が、例えば、0.1%~99.5%、好ましくは0.5~90%の割合で用いられる。本発明医薬組成物は、経口的又は非経口的に安全に投与することができる。非経口的投与形態として、例えば、組織内投与等の局所投与、皮下投与、筋肉内投与、動・静脈内投与、経直腸投与等が挙げられる。周知慣用の技術手段を用いてこれらの投与方法に適した製剤型を調製すればよい。

【0027】例えば、抗癌剤としての投与量は、患者の年齢、体重、投与経路、疾病の種類や程度等を考慮した上で設定することが望ましいが、ヒトへの投与の場合、通常は、成人に対して有効成分量として、経口的に1~10g/日、好ましくは5~6g/日で投与するのが一般的である。また、非経口的には、投与経路により大きく異なるが、通常、100~10000mg/日、好ましくは2~5g/日の範囲で投与すればよい。場合によっては、これ以下で充分であるし、また逆にこれ以上の用量を必要とすることもある。また1日2~4回に分割して投与することもできる。

【0028】経口投与は、固形又は液状の用量単位、例えば、末剤、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、シロップ剤、エリキシル剤又は懸濁剤その他の剤型によって行うことができる。

【0029】末剤は、活性物質を適当な細かさにより製造される。散剤は活性物質を適当な細かさとし、ついで同様に細かくした医薬用担体、例えば澱粉、マンニトールのような可食性炭水化物その他賦形剤と混合することにより製造される。必要に応じ矯味剤、保存剤、分散剤、着色剤、香料その他のものを混じてもよい。

【0030】カプセル剤は、まず上述のようにして粉末状にした末剤や散剤又は錠剤を顆粒化したものを、例えばゼラチンカプセルのようなカプセル外皮の中へ充填することにより製造される。また、充填前に滑沢剤や流動化剤、例えばコロイド状のシリカ、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、固形のポリエチレングリコール等を任意に混合しておいてもよい。崩壊剤や可溶化剤、例えばカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシスターチナトリウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム等を添加すれば、カプセル剤が撰

取されたときの医薬の有効性を改善することができる。

【0031】また、本品の微粉末を植物油、ポリエチレングリコール、グリセリン、界面活性剤中に懸濁分散し、これをゼラチンシートで包んで軟カプセル剤とすることができる。

【0032】顆粒剤は、粉末状にした活性物質と上述の賦形剤や崩壊剤を混合したものに、必要に応じ結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等）、及び、湿潤剤（例えばシロップ、澱粉糊、アラビアゴム、セルロース溶液又は高分子物質溶液等）を加えて練合し、ついで篩を強制通過させて調製することができる。このように粉末を顆粒化するかわりに、まず打錠機にかけたのち、得られる不完全な形態のスラグを破碎して顆粒にすることもできる。あらかじめ溶解遅延化剤（例えば、パラフィン、ワックス、硬化ヒマシ油等）、再吸収剤（例えば、四級塩等）又は吸着剤（例えばベントナイト、カオリン、リン酸ジカルシウム等）等を混合しておいてもよい。

【0033】錠剤は、このようにして作られる顆粒剤に、滑沢剤としてステアリン酸、ステアリン酸塩、タルク、ミネラルオイルその他を添加し打錠することにより調製することができる。こうして製造した素錠に更にフィルムコーティングや糖衣を施してもよい。

【0034】本発明の活性成分は、上述のように顆粒化やスラグ化の工程を経ることなく、流動性の不活性担体と混合した後直接打錠してもよい。シェラックの密閉被膜からなる透明又は半透明の保護被覆、糖や高分子材料の被覆、及び、ワックスよりなる磨上被覆等も用いることができる。

【0035】他の経口投与剤型、例えばシロップ剤、エリキシル剤及び懸濁剤等もまたその一定量が薬物の一定量を含有するように用量単位形態にすることができる。シロップ剤は、活性物質を適当な香味水溶液に溶解して製造され、またエリキシル剤は非毒性のアルコール性担体を用いることにより製造される。懸濁剤は、活性物質を非毒性担体中に分散させることにより処方される。懸濁化剤や乳化剤（例えば、エトキシ化されたイソステアリルアルコール類、ポリオキシエチレンソルビトールエステル類）、保存剤、矯味剤（例えば、ペパミント油、サッカリン）その他もまた任意に添加することができる。

【0036】必要に応じて、経口投与のための用量単位処方はいくつかのカプセル化してもよい。この処方ではまた被覆をしたり、高分子・ワックス等の中に活性物質を埋めこんだりすることにより作用時間の延長や持続放出をもたすこともできる。

【0037】皮下、筋肉内又は動・静脈内投与は、液状

用量単位形態、例えば溶液や懸濁液の形態の注射剤とすることによって行うことができる。これらのものは、活性物質の一定量を、注射の目的に適合する非毒性の液状担体、例えば水性や油性の溶剤に溶解又は懸濁し、ついでこの溶液又は懸濁液を滅菌することにより製造される。また、粉末又は凍結乾燥した活性物質の一定量をバイアルにとり、その後バイアルとその内容物を滅菌し密閉してもよい。この場合、投与直前に溶解又は混合するために、予備的なバイアルや担体を準備しておいてもよい。注射液を等張にするために非毒性の塩や塩溶液を添加してもよく、さらに安定化剤、保存剤、懸濁化剤及び乳化剤等を併用することもできる。

【0038】経直腸投与剤型は、疎水性又は親水性の坐剤基剤、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級エステル類（例えばパルミチン酸ミリスチルエステル）及びそれらの混合物に活性物質を練合することによって調製することができる。

【0039】

【実施例】以下に本発明の製造例及び実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

製造例1 サメ軟骨の油脂マトリックス被覆製剤の製造
高速攪拌造粒機（ハイスピードミキサー：深江工業社製）に、平均粒径が $27\mu\text{m}$ である微粉状サメ軟骨60重量部を仕込み、機内温度を 10°C に保ち、 $20\sim 100\text{rpm}$ の攪拌をかけながら、熔融した牛脂硬化油（融点 48°C ）10重量部を噴霧した。熔融油脂は、微粉状サメ軟骨を取り込みながらマトリックスを形成したが、この段階では表面にサメ軟骨が露出していて、充分な被覆性能が得られないので、更に、この一次マトリックスの表面に融点の異なる脂質類として、平均粒径 $5\mu\text{m}$ の微粉状ナタネ硬化油（融点 68°C ）30重量部を同一攪拌機造粒機内において攪拌速度約 1000rpm で30分間攪拌し、配位、展着させることにより、耐酸性及び徐放性を有する良好な油脂マトリックス被覆製剤を調製した。

【0040】実施例1 マウスによる腫瘍新生血管抑制作用試験（サメ軟骨粒径の評価）

ドーサル・エア・サック（dorsal air sac）法により試験した。径 5mm のプラスチックリングの両面に、ミリポアフィルターをはり、その中に 1×10^6 個のMH-134腫瘍細胞を培養液とともに注入してチャンバーを作成した。マウスを1群6匹に分け、マウス背部皮下にこのチャンバーを挿入した。4つの群のマウスに、4日間、下記に示すサメ軟骨を $1000\text{mg}/\text{k g}$ 経口投与し、5日めに新生血管の阻害程度を評価した。もう1つの群には、コントロールとしてサメ軟骨を全く投与せずに経過させて5日めに同様に阻害程度を評価した。腫瘍からの新生血管促進物質がミリポアフィルターを透過するごとにチャンバーに接した面に新生血

管が増生して観察される。この腫瘍の新生血管はラセン状を呈している。この新生血管の増生の阻害程度を、以下の評価基準に従って評価した。

(++) 3点：新生血管の増生が著明である

(+) 2点：新生血管が増生している

(±) 1点：新生血管がやや増生している

(-) 0点：新生血管の増生が全く認められない

また、抑制率は、コントロール群に対するスコアの減少率(%)で表した。

【0041】サメ軟骨(1)：サメ軟骨の原料として、米国産サメ軟骨製品であるカーティレイドを用い、このものを液体窒素(-196℃)で瞬間冷凍し、カッター

式粉碎機(オリエントミル)で粗粉碎した。次に冷凍状態のまま、高速ローター型粉碎機(インペラールミル)にて粉碎し、最後に気流式粉碎機(ジェットミル)にて更に粉碎して取得し、採用した。

サメ軟骨(2)：上記のサメ軟骨(1)を32μmのフルイにかけて通過しなかったものを採用した。

サメ軟骨(3)：上記のサメ軟骨(1)を32μmのフルイにかけて通過したものを採用した。結果を、表1に示した。

【0042】

【表1】

	++ (3点)	+(2点)	± (1点)	- (0点)	スコア	抑制率 (%)
コントロール	4匹	2匹	0匹	0匹	2.7±0.5	--
サメ軟骨(1)	2匹	3匹	1匹	0匹	2.2±0.8	18.5
サメ軟骨(2)	2匹	4匹	0匹	0匹	2.3±0.5	14.8
サメ軟骨(3)	1匹	4匹	1匹	0匹	2.0±0.8	25.9*

*P<0.05

【0043】以上の結果から、サメ軟骨のうちでも、32μmのフルイを通過する程度の粒径を有したサメ軟骨粉碎粉末が新生血管阻害作用が高いことが判った。

【0044】実施例2 マウスによる腫瘍新生血管抑制作用試験(カーティレイドとベターシャークとの比較) 実施例1と同様にドーサル・エア・サック法を用いて米国産サメ軟骨であるカーティレイドとヨシキリザメのサメ軟骨(ベターシャーク)との比較検討をした。結果を表2に示した。カーティレイドでは、100mg/kg投与群で抑制率(コントロール群に対する点数の低下%)は、3.6%であったが、1000mg/kg投与

群では、抑制率が、21.4%であり、有意差(P<0.05)が認められた。これに対して、ベターシャークでは、100mg/kg投与群で抑制率が17.9%であり、有意差(P<0.05)が認められ、1000mg/kg投与群で抑制率が35.7%と最も高い値を示し、有意差(P<0.002)が認められた。また、カーティレイドとベターシャークの間でも、有意差が認められた(P<0.05)。

【0045】

【表2】

	投与量 (mg/kg)	++ (3点)	+(2点)	± (1点)	- (0点)	スコア	抑制率 (%)
コントロール	--	9匹	1匹	0匹	0匹	2.8±0.4	--
カーティレイド	1000	3匹	6匹	1匹	0匹	2.2±0.8	21.4*
カーティレイド	100	6匹	4匹	0匹	0匹	2.7±0.5	3.6
ベターシャーク	1000	3匹	2匹	5匹	0匹	1.8±1.0	35.7**
ベターシャーク	100	5匹	4匹	1匹	0匹	2.3±0.8	17.9*

*P<0.05 **P<0.002

【0046】以上の結果から、サメ軟骨のうちでも、カーティレイドよりもベターシャークがより腫瘍新生血管阻害活性が高いことが判った。

【0047】実施例3 マウスによる腫瘍増加抑制試験(ベターシャークの効果発現量測定試験)

腫瘍細胞(Sarcoma-180)の1×10⁶個をICRマウス(雄、6週齢)を1群10匹で3群の背部皮下に移植し、その直後から、カーティレイド(米国産)を1000mg/kgで1日1回連続20日間経口投与した群、ベターシャーク(ただし、粒径を32μm

以下に揃えたものであって、pH2において、3時間静置しても安定であったもの)を同量同期間投与した群、及び、何も投与しないで20日間飼育した群の3群を試験に供して、25日経過後に屠殺して腫瘍重量を計測した。結果を表3に示した。抑制率は、コントロール群に対する重量の減少率(%)で示した。カーティレイド投与群では、コントロール群に対して、11.1%の抑制率であったのに対して、ベターシャーク投与群では、47.0%で有意差(P<0.001)が認められた。またカーティレイドとベターシャークとの比較でも、ベタ

ーシャークの方が、より強い抗腫瘍作用を有することが判った ($P < 0.05$)。

【0048】

【表3】

	平均腫瘍重量 (g)	抑制率 (%)
コントロール	2.752 ± 1.388	—
カーティレイド	2.446 ± 1.139	11.1*
ベターシャーク	1.457 ± 1.965	47.0**

* $P < 0.05$ ** $P < 0.001$

【0049】以上の結果から、ベターシャーク（粒径 $3.2 \mu\text{m}$ 以下）を用いた場合には、臨床においては、1日 20 g/body でも充分の有効性が認められるものと推察することができた。

【0050】実施例4 マウスによる鎮痛効果試験
ベターシャークの鎮痛効果を、酢酸ライシング (Writhing) で検討した。ICRマウス（雄、5週齢）

を1群10匹で5群に分け、各被検検体を各群に以下のように投与し、40日経過後に、2%酢酸を腹腔内に投与して、酢酸投与後、10日～20日の間にマウスが振り返り反射を起こした回数を計測した。被検検体は、投与後連日計測が終わるまで投与を続けた。カーティレイド投与群は、カーティレイドを1日当たり 1000 mg/kg 経口投与、ベターシャーク投与群は、ベターシャークを1日当たり 1000 mg/kg 経口投与、ベターシャーク投与群は、インダシン投与群は、インダシン（非ステロイド系鎮痛剤。市販品）を1日当たり 25 mg/kg 経口投与、コンドロイチン硫酸投与群は、コンドロイチン硫酸（市販品）を1日当たり 333 mg/kg 経口投与、コントロール群は、何も投与しないで飼育したものであった。抑制率は、コントロール群に対する回数減少率 (%) で表した。結果を、表4に示した。鎮痛効果においても、ベターシャークの優位性が示された。

【0051】

【表4】

	振り返り反射回数	抑制率 (%)
コントロール	31.2 ± 9.6	—
カーティレイド	24.3 ± 3.9	23.6*
ベターシャーク	21.2 ± 10.4	32.1*
インダシン	10.3 ± 5.6	67.0**
コンドロイチン硫酸	23.4 ± 4.5	25.0*

* $P < 0.05$ ** $P < 0.001$

【0052】実施例5 ベターシャーク製剤投与の臨床例による免疫学的特異抗原の発現

ヒト（男性、80歳）は上腹部不快感を訴え、胃内視鏡で胃角上部にIIc進行型の胃癌（印鑑細胞癌）があると診断された。生検材料を電子顕微鏡、組織生検（免疫学的検討）に用いた。心筋梗塞があるため、手術不能であった。実施例1で用いたサメ軟骨（3）（以下、実施例5において「ベターシャーク」という）を、上記の患者に対して、1日 20 g 経口連日投与した。電子顕微鏡所見と免疫学的特殊染色所見（第1回の胃内視鏡）は、ベターシャーク投与前では、通常の癌細胞の一般的所見のみでapoptosisを示す所見は極めて軽度であり、Fas抗原（特殊染色）の接着因子（蛍光抗体法）も認められず、HSP60（ストレス蛋白、heat shock protein 蛍光抗体法）の発現も認められなかった。第1回内視鏡から2カ月半経過した後の胃内視鏡では、癌の周辺は一見正常粘膜で覆われているような所見で、周囲の癌の隆起も平坦になりつつあった。第2回の生検における電子顕微鏡所見は、細胞膜と細胞質に特別の変化が認められないのに対して、癌

細胞の核のくびれ分裂が明らかとなり、apoptotic bodyが認められた。即ち、癌細胞におけるapoptosisを示す陽性所見が認められた。

【0053】この時期の生体組織において免疫学的特殊染色を行った。抗HSP60抗体、抗CD80抗体、抗CD86抗体、更には抗Fas抗体を用いて癌細胞を検討した。ベターシャーク製剤投与でFas抗原が陽性となり、更にHSP60及びCD80とCD86の接着因子が陽性となった。第3回（第1回から約5カ月後）の胃内視鏡で胃角上部の癌は完全に消失していた。胃癌があった部位の生検では、いずれも癌細胞は陰性であった。

【0054】以上の所見をまとめると、ベターシャーク製剤投与前に認められていないFas抗原、HSP60抗原、CD80とCD86の接着因子が、ベターシャーク製剤投与後2カ月半でいずれも陽性となった。その後、第3回の胃内視鏡で癌が完全に消失していた。この現象は、ベターシャーク製剤投与により腫瘍の血流が阻害されたため、ストレス蛋白（HSP60）が発現し、Fas抗原、CD80とCD86の接着因子が陽性とな

ったと考えられ、その後第3回の内視鏡で腫瘍が完全縮小していることが証明された。

【0055】腫瘍免疫学の研究から、腫瘍の退縮には、necrosis（壊孔）とapoptosisの2種類があることが判っていた。necrosisは、非特異的免疫が作用して炎症等の要因で腫瘍が消失する現象であり、細胞膜、細胞質ついで核の変性の順で腫瘍細胞が破壊される。このnecrosisの場合は、組織学的には、好中球、マクロファージ、線維芽細胞等が浸潤した後、石灰化、繊維化が起こり癌が消失する。その結果、局所には痕跡が残る。

【0056】一方、apoptosisで腫瘍が消失する場合は、全く炎症は起こらずに痕跡が認められずに正常組織に置き変わっている。この場合は、キラーT細胞が腫瘍細胞の表面のFas抗原を認識して接着し、同時にCD80及び／又はCD86等の接着因子の共同作用でapoptosisを誘導することが判っている。まず核の変性（核の分裂と核小体（apoptotic body））が起こってから細胞質と細胞膜とがマクロファージによって喰食される。従って痕跡が残らない。ベータシャーク製剤投与例は、いずれの症例でも癌の消失部位に石灰化繊維化等の炎症残存所見が認められないことから、apoptosisによる癌の消失が示唆された。また、極めて短期間（1カ月～1カ月半）で癌が消失していることが明らかであった。

【0057】実施例6 マウスによる免疫学的特異性試験

Sarcoma180腫瘍細胞をマウス背部に移植し、TNP470（武田薬品工業社製）を10mg腹腔内投与した群、ベータシャーク1000mg/kgを経口投与した群、及び、アンジオスタチン（化学及血清療法研究所製）を24μg腹腔内投与した群、について、何も投与していないコントロール群との対比により腫瘍の発育抑制効果を検討した。いずれの群も、コントロール群に比較して2週め及び3週めで有意差（ $P<0.05$ ）をもって腫瘍増殖を抑制していることが判った。この時

期の腫瘍組織において、HSP60、Fas抗原、CD80及びCD86の発現を免疫組織学的に検討した。その結果、HSP60、Fas抗原、CD80及びCD86の発現が有意に増加していた。

【0058】一方、T細胞欠損マウスであるヌードマウスを用いて上記と同様の実験を行ったところ、ある程度の腫瘍増殖抑制効果を認めたが有意差はなかった。腫瘍組織の免疫組織学的検討では、HSP60、Fas抗原、CD80及びCD86の発現は陽性であった。しかし、apoptosisの所見は認められなかった。

【0059】以上の結果から、新生血管阻害剤の抗腫瘍作用は単なる腫瘍に対する阻血のみによるものではなく、腫瘍の阻血状態におけるストレス蛋白の発現、又は、Fas抗原、CD80、CD86等の質的量的な発現の変化をキラーT細胞が認識して、抗腫瘍作用を発揮し、apoptosisが誘導されたものであると考えられた。

【0060】実施例7～10 AHCCとベータシャークとの併用投与例

表5に示す癌罹患ヒトについて、AHCCを3.0g/日の用量で連日投与すると同時に、ベータシャークを20g/日の用量で経口投与により連日投与した。3カ月投与した後、治療判定とNK活性、IL-12数値及びCD4/CD8の値を測定した。実施例7及び実施例10においては、いずれも50%以上の腫瘍の縮小を認めた。しかし、NK活性は、いずれも正常値であり活性が亢進していないことが判った。実施例7～10のいずれにおいても、IL-12値は、正常範囲をはるかに超えて高い値を示した。腫瘍の縮小には、IL-12が関与していることが推察できた。なお、表5中、CD4は、ヘルパーT細胞、CD8は、キラーT細胞を表す。CD4/CD8の値は、キラーT細胞の増量の度合いを表し、1以下であれば、キラーT細胞が増量していることを表す。正常値は、1.0～1.5である。

【0061】

【表5】

	ヒト	症状	NK活性	血清中IL-12値	治療判定	CD4/CD8値
実施例7	72歳、男性	胃癌 進行癌	24%	240ng/mL	CR 完全縮小	0.34
実施例8	57歳、男性	盲腸癌 癌性腹膜炎 末期癌	62%	230ng/mL	CR 完全縮小	0.42
実施例9	69歳、男性	胃癌 肝転移 末期癌	62%	103ng/mL	CR 完全縮小	0.62
実施例10	71歳、女性	肝癌 肺転移 末期癌	68%	78ng/mL	PR 転移消失	0.84

【0062】

【発明の効果】本発明の腫瘍新生血管阻害物質は、サメ

軟骨の不快な味、臭いを消失させ、耐酸性かつ腸溶性であり経口投与に利便性があり、そのうえ確実な抗癌作用と鎮痛作用とを併せ有するので医薬組成物として極めて

有用である。本発明の腫瘍新生血管阻害物質とインターロイキン 12 誘導物質との併用は、極めて高い抗癌活性を示すので、医薬組成物として極めて有用である。

POWERED BY **Dialog**

Use of pulverised cartilage of shark and interleukin-12 - as angiogenesis inhibitor to treat tumours
Patent Assignee: NIPPON OILS & FATS CO LTD; SEISHIN KIGYO KK; YAGITA A; NOF CORP

Patent Family

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
JP 10147534	A	19980602	JP 96324595	A	19961119	199832	B
KR 98042506	A	19980817	KR 9760573	A	19971117	199937	
JP 3103513	B2	20001030	JP 96324595	A	19961119	200057	

Priority Applications (Number Kind Date): JP 96324595 A (19961119)

Patent Details

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
JP 10147534	A		9	A61K-035/60	
KR 98042506	A			A61K-035/60	
JP 3103513	B2		9	A61K-035/60	Previous Publ. patent JP 10147534

Abstract:

JP 10147534 A

Use of pulverised cartilage of shark (I) (e.g. blue shark, *Prionace glauca* L.), of size 32 μ m or less at 99.5 wt.% or more, embedded in fat matrix and further coated with another fat of different melting point as an angiogenesis inhibitor in tumour treatment is new.

USE - (I) are used in combination with interleukin-12 and is administered orally at a dose of 0.1-10 (preferably 5-6) g/day or parenterally at a dose of 0.1-10 (preferably 2-5) g/day.

ADVANTAGE - Enteric soluble medicinal compositions without unpleasant taste or odour of shark cartilage are obtained with improved anticancer effects in combination with interleukin-12, inducing apoptosis of cancer cells.

Dwg.0/0

Derwent World Patents Index

© 2002 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 11954131